

【202】

氏名	中 野 誠
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 1869 号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	扁平上皮癌細胞株におけるシスプラチン耐性機構へのメタロチオネインの関与について
論文審査委員	教授 岸 幹二 教授 松村智弘 教授 古田裕昭

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

現在、口腔癌の治療には手術療法、放射線療法ならびに化学療法の3者併用療法が行われている。このうち化学療法の治療効果を妨げる要因の一つに、癌細胞の抗癌剤に対する自然耐性、獲得耐性がある。これらの耐性機構の解明は耐性克服、さらには治療効果の向上のために不可欠である。

メタロチオネイン(MT)は分子量約6000のシステイン高含有蛋白質であり、重金属との結合能が高いことから、重金属の解毒や毒性の防御に関わるとされている。そして、プラチナ系抗癌剤シスプラチン(CDDP)に対する耐性にもMTの関与を示唆する多くの報告がある。しかし、CDDPの耐性機構へのMTの関与を疑問視する報告もあり、議論の対象となっている。

本研究では、口腔癌の大部分を占める扁平上皮癌においてCDDP耐性機構へのMTの関与を明らかにすることを目的とし、分化型の異なる癌より分離された2種類のヒト舌扁平上皮癌細胞株を使用し、*in vitro*においてCDDP耐性とMT発現との相関を検討した。

### 【材料ならびに方法】

#### ①細胞株と分化傾向の観察

ヒト舌扁平上皮癌細胞株であるSCC-9(高分化型由来)およびCAL27(低分化型由来)を使用した。培養は、10%ウシ胎仔血清を含む培地(SCC-9:45%DMEM+45%ハムF-12、CAL27:90%DMEM)を使用し、37℃、5%CO<sub>2</sub>気相下で行った。この2種類の細胞株は異なる分化型の扁平上皮癌に由来するので、抗サイトケラチン(抗CK8, 抗CK10)および、抗インボルクリン(抗INV)モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、*in vitro*における分化傾向の違いを観察した。細胞をチャンバースライド上で培養後、アセトンまたはパラホルムアルデヒドにより固定し、ABC法にて免疫染色した。また、ポジティブコントロールとして、正常ヒト表皮角化細胞株であるNHEKを使用した。

#### ②MT蛋白質の細胞内における局在の観察

①と同様に、抗MT-I/IIモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。

#### ③CDDP感受性試験

ディッシュ(φ60mm)に細胞を播種し、24時間後にCDDPを添加して1時間作用させた後にPBS洗浄を行い上記の培地に交換した。生理的食塩液を添加した対照ディッシュ中のコロニーが計数可能となるまで培養した後、メチレンブルー染色しコロニー数を計測した。コロニー形成率は対照との比較により算出した。

#### ④MTmRNA発現量の定量的解析

ディッシュ(φ90mm)に細胞を播種し、その対数増殖期においてCDDPを添加した。1時間作用させた後にPBSにて洗浄し、上記の培地に交換した。一定時間培養後、全RNAをAGPC法にて抽出した。さらにDNase処理後、MT-I/II共通配列を特異的に認識するPCRプライマーを用い、RT-PCR法によりMTmRNAの発現量を定量的に解析した。

#### ⑤MT蛋白質の定量

ディッシュ(φ90mm)に細胞を播種し、④と同様にCDDPを作用させ、その24時間後に細胞を回収した。細胞質成分を精製した後、②で使用したモノクローナル抗体を用いたELISA法によりMT蛋白量を定量した。

#### ⑥MTアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果

CDDP耐性とMTの関与を検討するため、CDDP低感受性を示す細胞に対して、MT-I/II遺伝子のATG配列から7塩基下流の18塩基に相補的な、アンチセンスオリゴヌクレオチドを培地中に添加し、③と同様にCDDP感受性試験を行った。対照にはセンスおよびランダムオリゴヌクレオチド(21塩基)を用いた。

#### **【結果】**

##### ①in vitroにおける細胞分化の傾向

定常期に達したSCC-9は、CAL27より分化を示す傾向が見られた。しかし、対数増殖期においては、SCC-9とCAL27に染色性の差はほとんど見られなかった。

##### ②MT蛋白質の細胞内における局在

MT蛋白質はSCC-9とCAL27で共に胞体内に局在が認められた。

##### ③CDDP感受性試験

コロニー形成50%抑制濃度はCAL27で0.75μg/ml以下、SCC-9では11μg/mlであり、CAL27の方がSCC-9より有意にCDDP感受性が高かった。

##### ④⑤MTmRNAおよびMT蛋白質の発現量

CDDP添加後にMTmRNAおよびMT蛋白質の発現量は、SCC-9では共に増加したが、CAL27では増加しなかった。このSCC-9におけるMTmRNAの発現量増加は、CDDP添加した3、6、12時間後に認められた。

##### ⑥MTアンチセンスの効果

MTアンチセンスを添加することにより、CDDPに対して低感受性であったSCC-9の感受性が上昇した。

#### **【考察】**

細胞増殖が定常期に達した後では高分化型由来の方が、低分化型由来の細胞より分化を示す傾向が見られた。しかし対数増殖期においては、分化程度に差はほとんど見られなかった。本研究では、CDDPは全て対数増殖期に添加したので、2種類の細胞のCDDPに対する感受性の差は細胞分化の結果によるものではないと考えられる。

これまではCDDP耐性と細胞内MTの存在との相関について検討されてきた。本研究において、CDDPに高感受性を示す細胞の胞体内にもMT蛋白質の局在を認めた事は、細胞内にMTが既存しても、CDDP添加後に発現量の増加がなければ、MTはCDDP耐性機構に関与できないものと考えられる。

一般的にはCDDPによる速効性のMT誘導はないと考えられてきたが、本研究ではCDDPに対し低感受性の細胞においてのみ、有意にMTの発現量増加がみられた。このことからCDDPによりMTが誘導され、この新たに誘導されたMTが耐性機構に関与している可能性が示唆された。

MTアンチセンスを添加し一過性にMTの発現量を減少させることにより、CDDP低感受性細胞の感受性を上昇させたことは、この細胞の自然耐性に新たに誘導されたMTが関与していることを示唆するものである。

#### **【結語】**

以上より、CDDP低感受性細胞ではCDDPの添加による速効性のMT発現が、耐性機構に寄与しているものと考えられる。そして、今まで②③の結果のみからMTとCDDP耐性の相関性がないと判断されてきた癌細胞についても、MTが耐性機構に関与する可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

癌治療において化学療法剤に対する自然耐性、獲得耐性など薬物耐性は治療を妨害する要因の一つとされ、それら耐性の克服は癌に対する治療効果向上に不可欠である。現在、抗癌剤に対する耐性機構がいくつか考えられているが、その一つとして生体内における金属結合蛋白質メタロチオネイン(MT)の各種抗癌剤の作用に対する関与が注目されてきた。特に口腔癌の治療に広く用いられている白金含有物質であるシスプラチン(CDDP)の耐性においてMTの関与が関心を呼んでいる。

本研究にはCDDP感受性の異なる2種類の舌由来扁平上皮癌細胞株を使用して*in vitro*においてCDDP作用時のメタロチオネイン合成の活性化をmRNAおよび蛋白レベルで証明した上、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてMTを抑制することにより、新たに生成されたMTがCDDP耐性に関わっていることを証明している。

以上のことは、CDDP耐性におけるMTの関与機構について新しい概念を提議するものであり、本申請論文は学位論文として価値があるものと認めた。